UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO

Dipartimento di Ingegneria Industriale

Corso di Laurea in Ingegneria Chimica

Studio del processo di produzione di Vitamina C liposomiale

Tesi in

Fenomeni di trasporto

Relatori:

Prof. Ing. Gaetano Lamberti

Dott. Ing. Diego Caccavo

Ing. Rosario Cavallo

Candidata:

Lucia Dell'Anno

matricola 062221250

Anno Accademico 2020/2021

Ai miei genitori,

a zia Mariagrazia, ai miei nonni

Sommario

Sommario I

Indice delle figure IV

Indice delle tabelle VI

Abstract VIII

Introduzione 1

1.1 Fonti di Vitamina C _____ 2

1.1.1 Problematiche della Vitamina C 4

1.2. Liposomi _____ 5

1.3 Metodi tradizionali di produzione di liposomi _____ 7

1.3.1 Metodo di Bangham 7

1.3.2 Metodo dell'iniezione 8

1.3.3 Metodo dell'emulsione 11

1.4 Metodi recenti di produzione di liposomi _____ 12

1.4.1 Metodo con liofilizzazione 12

1.4.2 Metodo microfluidico 13

1.5 Vitamina C liposomiale _____ 18

1.6 Obiettivi _____ 20

Materiali, apparecchiature e metodi 21

2.1 Materiali 22
2.1.1 L- α fosfatidilcolina di soia 22
2.1.2 Vitamina C 23
2.1.3 Solventi 23
2.2 Apparecchiature 24
2.2.1 Omogeneizzatore e mixer 24
2.2.2 Ultracentrigufa 25
2.2.3 DLS 26
2.3 Metodi 26
2.3.1 Metodo della titolazione con soluzione di iodio e salda d'amido 26
2.3.2 Diluizione di sospensioni liposomiali 28
Risultati e discussione 31
3.1 Metodo di analisi 32
3.2 Formulazione della Vitamina C liposomiale 36
3.2.1 Riproduzione di una formulazione di letteratura 36
3.2.2 Sostituzione della Glicerina con Etanolo 39
3.2.3 Riduzione del contenuto di Glicerina e Lecitina di soia 41
3.2.4 Acido ascorbico e Ascorbato di sodio 44
3.3 Processo di Produzione 45
3.3.1 Semplificazione del processo: dall'omogeneizzatore al mixer 45
3.3.2 Produzione nel mixer al variare dell'energia conferita per unità di massa 48
Conclusioni 53
4.1 Conclusioni 54
Bibliografia 55

Indice delle figure

Figura 1 Classificazione schematica dei vari liposomi in funzione della loro struttura e dimensione: SUV (piccole vescicole unilammellari), LUV (grandi vescicole unilamellari), GUV (vescicole giganti unilamellari), MLV (vescicole multilamellari).[8]..... 6

Figura 2 Descrizione delle fasi del metodo di Bangham: 1) I lipidi polverizzati in miscela con un farmaco lipido-solubile sono addizionati al solvente organico; 2) Rimozione del solvente organico mediante essiccazione e ottenimento di uno strato lipidico; 3) Addizione di una soluzione acquosa contenente il farmaco idrosolubile [21]. 8

Figura 3 Schema generale relativo ai due metodi tradizionali di iniezione: (a) metodo di iniezione con etanolo (b) metodo di iniezione con etere [13]. 9

Figura 4 Schema generale delle varie fasi necessarie alla formazione dei liposomi utilizzando la tecnica dell'emulsione. 12

Figura 5 Schema di processo realtivo alla liofilizzazione della soluzione liposomiale [49]. 13

Figura 6 Schematizzazione del metodo microfluidico per la formazione controllata dei liposomi [53]..... 14

Figura 7 Differenti conformazioni microfluidiche utilizzate: flusso a singola focalizzazione (SHM) con canali a 3 ingressi in cui gli angoli di intersezione tra canali centrali e obliqui sono 90° in (A) e 45°in (B), (c) 5-inglessi e canali a 3 uscite, (d) Doppio flusso focalizzato (DHF) e (e) flusso co-assiale [31]..... 15

Figura 8 Schema di due differenti tipologie di micromiscelatore: (a) Dispositivo dotato di un micromiscelatore caotico (SHM), (b) Dispositivo dotato di micromiscelatore con setti. [31]..... 17

Figura 9 Struttura della L-α-fosfatidilcolina di soia: in rosso è rappresentata la colina e il gruppo fosfato, in nero il glicerolo, in verde l'acido grasso insaturo e in blu l'acido grasso saturo [47]. 22

Figura 10 Lecitina di soia utilizzata per la produzione dei liposomi 22

Figura 11 Le due fonti di Vitamina C utilizzate: a) Acido Ascorbico LaFood; b) Ascorbato di sodio Santé Naturels 23

Figura 12 a) Omogeneizzatore ad alti shaer; b) Impeller utilizzato 24

Figura 13 Mixer Moulinex (LM811D) 25

Figura 14 Ultracentrifuga 26

Figura 15 Complesso di colore blu-nero 27

Figura 16 Esempio andamento della temperatura nel tempo monitorato dalle termocoppie 33

Figura 17 Vitamina C liposomiale 37

Figura 18 Distribuzione dimensionale dei liposomi riproduzione formulazione di letteratura 39

Figura 19 Distribuzione dimensionale dei liposomi riproduzione con etanolo. 41

Figura 20 Distribuzione dimensionale dei liposomi con contenuto di glicerina e lecitina dimezzato 43

Figura 21 Distribuzione dimensionale dei liposomi con il contenuto più basso di glicerina e lecitina 43

Figura 22 Soluzioni liposomiali dopo il trattamento ad ultracentrifuga: a) solzuione con ascorbato di sodio; b) soluzione con acido ascorbico 44

Figura 23 Grafico Tempo-Energia ottenuto dall'analisi dei dati dell'esperimento per l'omogeneizzatore. 46

Figura 24 Grafico Tempo-Energia ottenuto dall'analisi dei dati dell'esperimento per il mixer. 47

Figura 25 Efficienza di incapsulamento - Tempo 49

Figura 26 Dimensione media - Tempo 50

Figura 27 Dimensione posseduta dal 50% delle particelle – Tempo 51

Indice delle tabelle

Tabella 1 Percentuale massica di vitamina C e di minerale nelle varie fonti. 4

Tabella 2 Caratteristiche principali dell'Acido Ascorbico e dell'Ascorbato di sodio 23

Tabella 3 Coefficienti di van't Hoff 29

Tabella 4 Percentuale di acido ascorbico totale nei prodotti commerciali 32

Tabella 5 Isotoniche per i prodotti commerciali 34

Tabella 6 Risultati dell'analisi dell'efficienza di incapsulamento relative ai prodotti commerciali 35

Tabella 7 Ricetta per la preparazione della soluzione di lipidi 36

Tabella 8 Ricetta per la preparazione della soluzione acquosa di ascorbato di sodio 36

Tabella 9 Composizione della sospensione liposomiale 37

Tabella 10 Confronto dell'effetto della diluizione in acqua e isotonica sull'efficienza di incapsulamento 38

Tabella 11 Composizione della sospensione liposomiale con etanolo 40

Tabella 12 Confronto dell'efficienza di incapsulamento della produzione con etanolo e con glicerina 40

Tabella 13 Composizione delle produzioni a diverse concentrazioni 41

Tabella 14 Efficienza di incapsulamento e carico delle produzioni a diverse concentrazioni 42

Tabella 15 Composizione della produzione con acido ascorbico 44

Tabella 16 Composizione Produzione totale 48

Abstract

Vitamin C, a representative water-soluble vitamin, has a variety of biological, pharmaceutical and dermatological functions. Vitamin C is widely used in various types of foods as a vitamin supplement and as an antioxidant. This is an important antioxidant that may reduce the risk of cancer by neutralizing reactive oxygen species or other free radicals that can damage DNA.

However, vitamin C is very unstable to air, moisture, light, heat, oxygen and base, it easily decomposes into biologically inactive compounds. Degradation of vitamin C can be effectively reduced by its association with the hydrophilic–hydrophobic interface, which can be provided by lipid aggregates. Lipid aggregates, such as liposomes, are well suited for this purpose. They reduce the vitamin C degradation in the gastrointestinal tract, slow down its release and enhance absorption. In addition, it is not to be overlooked that lipids, phosphatidylcholines in particular, are an important component of a balanced diet with documented positive effects on the patient overall wellbeing.

In this thesis work a liposomal formulation of vitamin C was developed and tested. Various parameters of the formulation were investigated such as the use of the solvent, the lecithin content, and the use of the different sources of Vitamin C. A method for calculating the load and encapsulation efficiency has been developed.

The production process has been simplified, the homogenizer has been replaced by a mixer; to do this, the energy transferred to the fluid has been calculated. The encapsulation efficiency has been evaluated at different amount of energy supplied to the fluid. In conclusion, it was obtained liposomial vitamin C with an efficiency of encapsulation ranging between 40- 50% and liposomes size of 230 nm.

Bibliografia

1. EFSA, *Scientific Opinion on the re-evaluation of ascorbic acid (E 300), sodium ascorbate (E 301) and calcium ascorbate (E 302) as food additives.* Efsa Journal, 2015. **13**(5): p. 4087.
2. EFSA, *Calcium ascorbate, magnesium ascorbate and zinc ascorbate added for nutritional purposes in food supplements.* EFSA Journal, 2009. **7**(3): p. 994.
3. EFSA, *Opinion of the Scientific Panel on Dietetic products, nutrition and allergies related to the Tolerable Upper Intake Level of Sodium.* EFSA Journal, 2005. **193**: p. 1-19.
4. EFSA, *Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of calcium.* EFSA Journal, 2012. **10**(7): p. 44.
5. Amiri, S., et al., *New formulation of vitamin C encapsulation by nanoliposomes: production and evaluation of particle size, stability and control release.* Food science and biotechnology, 2019. **28**(2): p. 423-432.
6. Łukawski, M., et al., *New oral liposomal vitamin C formulation: Properties and bioavailability.* Journal of liposome research, 2020. **30**(3): p. 227-234.
7. Yu, B., et al., *Targeted delivery systems for oligonucleotide therapeutics.* The AAPS journal, 2009. **11**(1): p. 195-203.
8. Lasic, D.D., *The mechanism of vesicle formation.* Biochemical Journal, 1988. **256**(1): p. 1-11.
9. Elhissi, A.M., et al., *New delivery systems–Liposomes for pulmonary delivery of antibacterial drugs.* Novel antimicrobial agents and strategies, 2014: p. 387-406.
10. Akbarzadeh, A., et al., *Liposome: classification, preparation, and applications.* Nanoscale research letters, 2013. **8**(1): p. 1-9.
11. Sharma, A., et al., *Activity of paclitaxel liposome formulations against human ovarian tumor xenografts.* International journal of cancer, 1997. **71**(1): p. 103-107.

12. Bangham, A.D. and R. Horne, *Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope.* Journal of molecular biology, 1964. **8**(5): p. 660-IN10.
13. Batzri, S. and E.D. Korn, *Single bilayer liposomes prepared without sonication.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1973. **298**(4): p. 1015-1019.
14. Deamer, D. and A. Bangham, *Large volume liposomes by an ether vaporization method.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis, 1976. **443**(3): p. 629-634.
15. Deamer, D.W., *Preparation and properties of ether-injection liposomes.* Annals of the New York Academy of Sciences, 1978. **308**(1): p. 250-258.
16. Stano, P., et al., *Novel camptothecin analogue (gimatecan)-containing liposomes prepared by the ethanol injection method.* Journal of liposome research, 2004. **14**(1-2): p. 87-109.
17. Maitani, Y., et al., *Modified ethanol injection method for liposomes containing β-sitosterol β-D-glucoside.* Journal of liposome research, 2001. **11**(1): p. 115-125.
18. Maitani, Y., et al., *Cationic liposome (DC-Chol/DOPE= 1: 2) and a modified ethanol injection method to prepare liposomes, increased gene expression.* International journal of pharmaceutics, 2007. **342**(1-2): p. 33-39.
19. Patel, H., *Liposomes: A practical approach: Edited by RRC New; Oxford University Press; Oxford, 1990; 301 pages;£ 22.50*. 1990, No longer published by Elsevier.
20. Kim, S. and G.M. Martin, *Preparation of cell-size unilamellar liposomes with high captured volume and defined size distribution.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1981. **646**(1): p. 1-9.
21. Li, C. and Y. Deng, *A novel method for the preparation of liposomes: freeze drying of monophase solutions.* Journal of pharmaceutical sciences, 2004. **93**(6): p. 1403-1414.
22. Shokri, M., M. Tavallaie, and S.M. Hosseini, *Effect of lyophilization on the size and polydispersity of unilamellar and multilamellar liposomes.* Journal of nanotechnology and material sciences, 2016. **3**: p. 37-40.

23. Yin, F., et al., *Preparation of redispersible liposomal dry powder using an ultrasonic spray freeze-drying technique for transdermal delivery of human epithelial growth factor.* International journal of nanomedicine, 2014. **9**: p. 1665.
24. Jahn, A., et al., *Controlled vesicle self-assembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing.* Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(9): p. 2674-2675.
25. Jahn, A., et al., *Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size.* Langmuir, 2007. **23**(11): p. 6289-6293.
26. Jahn, A., et al., *Freezing continuous-flow self-assembly in a microfluidic device: toward imaging of liposome formation.* Langmuir, 2013. **29**(5): p. 1717-1723.
27. Hood, R.R., et al., *A facile route to the synthesis of monodisperse nanoscale liposomes using 3D microfluidic hydrodynamic focusing in a concentric capillary array.* Lab on a Chip, 2014. **14**(14): p. 2403-2409.
28. Lim, J.-M., et al., *Ultra-high throughput synthesis of nanoparticles with homogeneous size distribution using a coaxial turbulent jet mixer.* ACS nano, 2014. **8**(6): p. 6056-6065.
29. Wagner, A., et al., *The crossflow injection technique: an improvement of the ethanol injection method.* Journal of liposome research, 2002. **12**(3): p. 259-270.
30. Costa, A.P., et al., *Liposome formation using a coaxial turbulent jet in co-flow.* Pharmaceutical research, 2016. **33**(2): p. 404-416.
31. Has, C. and P. Sunthar, *A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes.* Journal of liposome research, 2020. **30**(4): p. 336-365.
32. Pradhan, P., et al., *A facile microfluidic method for production of liposomes.* Anticancer research, 2008. **28**(2A): p. 943-947.
33. Jahn, A., et al., *Microfluidic mixing and the formation of nanoscale lipid vesicles.* ACS nano, 2010. **4**(4): p. 2077-2087.
34. Phapal, S.M. and P. Sunthar, *Influence of micro-mixing on the size of liposomes self-assembled from miscible liquid phases.* Chemistry and physics of lipids, 2013. **172**: p. 20-30.
35. Mijajlovic, M., et al., *Microfluidic hydrodynamic focusing based synthesis of POPC liposomes for model biological systems.* Colloids and surfaces B: biointerfaces, 2013. **104**: p. 276-281.

36. Stroock, A.D., et al., *Chaotic mixer for microchannels.* Science, 2002. **295**(5555): p. 647-651.
37. Nguyen, N.-T., *Micro-magnetofluidics: interactions between magnetism and fluid flow on the microscale.* Microfluidics and nanofluidics, 2012. **12**(1-4): p. 1-16.
38. Kimura, N., et al., *Development of the iLiNP device: Fine tuning the lipid nanoparticle size within 10 nm for drug delivery.* ACS omega, 2018. **3**(5): p. 5044-5051.
39. Huang, X., et al., *Ultrasound-enhanced microfluidic synthesis of liposomes.* Anticancer research, 2010. **30**(2): p. 463-466.
40. Patil, Y.P. and S. Jadhav, *Novel methods for liposome preparation.* Chemistry and physics of lipids, 2014. **177**: p. 8-18.
41. Shah, S., et al., *Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process.* Advanced Drug Delivery Reviews, 2020.
42. Marsanasco, M., et al., *Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment.* Food research international, 2011. **44**(9): p. 3039-3046.
43. XIE, W.L. and J.M. JI, *Antioxidant activities of vitamins E and C in a novel liposome system.* Journal of food biochemistry, 2008. **32**(6): p. 766-781.
44. Liu, X., et al., *Co-encapsulation of Vitamin C and β-Carotene in liposomes: Storage stability, antioxidant activity, and in vitro gastrointestinal digestion.* Food Research International, 2020. **136**: p. 109587.
45. Zhang, Y., *Method of making liposomes, liposome compositions made by the methods, and methods of using the same*. 2018, US 20120171280A1.
46. Jeung, J.J., *Vitamin c delivery system and liposomal composition thereof*. 2016, US 20160367480A1.
47. di Ingegneria Chimica, P., et al., *Stabilizzazione tramite spray drying di sospensioni liposomiali.*

Ringraziamenti

Un ringraziamento sentito va al Prof. Gaetano Lamberti, relatore di questa tesi, che con grande disponibilità mi ha permesso di realizzarla.

Un ringraziamento particolare va all'ingegnere Diego Caccavo per i preziosi consigli e l'infinita disponibilità e professionalità.

Desidero ringraziare l'ingegnere Rosario Cavallo per avermi dato le giuste indicazioni nella fase iniziale.

Un ulteriore ringraziamento agli ingegneri Raffaella De Piano e Marco Iannone per l'allegria e l'ospitalità trasmessa durante questi mesi